

Microbial colonisation is steered by host-microbe and microbe-
microbe interactions in the phyllosphere of *Arabidopsis thaliana*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Samuel Kroll

aus Hamburg

Köln, 2018

Summary

As higher eukaryotes, plants harbour various niches which are colonised by an enormous quantity and diversity of microbes, including bacteria, fungi, oomycetes and other protists. The sum of all plant-associated microbes is termed the ‘microbiota’. The composition of microbial communities is essential for plant fitness, since microbes facilitate traits like nutrient acquisition, abiotic stress tolerance as well as pathogen resistance and they promote growth. Furthermore, microbial communities are affected by various environmental stimuli, including nutrient availability and drought, but also by biotic factors such as host-microbe and microbe-microbe interactions.

To characterize the pathogenic symbiosis between *Arabidopsis thaliana* and the biotrophic oomycete *Albugo laibachii*, we performed quantitative trait loci (QTL) mapping on recombinant inbred lines (RILs). All RILs were generated by crossing Swedish with Italian *A. thaliana* ecotypes. We identified a QTL that is associated with partial resistance against *A. laibachii*. Furthermore, we revealed that presence of the QTL represents a significant fitness advantage at sites where *Albugo* sp. occur. This implies that *Albugo* sp. exerts an evolutionary pressure towards its host, *A. thaliana*, which causes local adaptation.

I further discovered that reproductive success of *A. laibachii*, determined by sporulation efficiency does not only depend on host-microbe but rather microbe-microbe interactions. Amplicon sequencing, followed by relative abundance-based network calculations of leaf microbial communities from *A. thaliana* populations, allowed us to predict potential interaction partners for the highly interconnected ‘hub’ microbe *Albugo*. To verify network-based predictions, I isolated phyllospheric fungi and bacteria which I co-inoculated with *A. laibachii* under gnotobiotic conditions. Another hub microbe, the basidiomycete yeast *Dioszegia hungarica*, promoted sporulation of *A. laibachii*, thereby validating our network-based prediction *in planta*. Furthermore, I verified additional interactions between *D. hungarica* and six phyllospheric bacteria *in planta*. Here *D. hungarica* especially decreased growth of *Caulobacter* sp. which itself is a hub microbe. Taken together, these results highlight the direct interplay between different hub microbes that steer microbial assembly in the phyllosphere.

To coherently understand microbial networks, studying static community compositions is not sufficient. Rather, causal factors and dynamics underlying time dependent community assemblies are needed. I therefore conducted a common garden experiment, sampling leaves of *A. thaliana* plants over a time course of five months in three consecutive years. While microbial compositions

varied taxonomically across months, my experiments revealed a continuous increase in network density and community stability over time. In support of that I identified members of the core-microbiota which maintained their network position over time as key factors for an increase in network connectivity and stability of microbial communities. I call this small group of stable, time independent core-microbial taxa Persistent Keystone (PerKy) microbes. Among them, I found *Dioszegia* sp. and *Sphingomonas* sp. to exhibit the strongest influence in the microbial network.

In complex synthetic microbial communities, in depth analyses of PerKy microbes confirmed their impact on communal function upon biotic perturbation, as they reduced the growth of the biotrophic pathogen *Pseudomonas syringae*. Since PerKy microbes impact communal stability in highly dynamic natural networks, they are key to designing persistent microbial communities. These communities can be applied in fluctuating environmental conditions. Therefore, my findings may bridge the gap between development of efficient probiotics in controlled laboratory conditions and their successful application in commercial agriculture.

Taken together, I identified novel traits which regulate colonisation of microbial hubs and pathogens. Those traits range in their complexity from host-microbe to microbe-microbe interaction in a synthetic community context. Therefore, they depict the full complexity by which microbial colonisation is steered in the phyllosphere.

Zusammenfassung

Als höhere Eukaryoten beherbergen Pflanzen verschiedene Nischen, die von einer enormen Menge und Vielfalt von Mikroben besiedelt sind, einschließlich Bakterien, Pilzen, Oomyceten und anderen Protisten. Die Summe aller pflanzenassoziierten Mikroben wird als „Mikrobiota“ bezeichnet. Die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften ist essentiell für die Fitness des Wirts, da Mikroben Eigenschaften wie Nährstoffaufnahme, Wachstumsförderung, abiotische Stresstoleranzen und Pathogenresistenzen beeinflussen. Verschiedene Faktoren beeinflussen die mikrobielle Gemeinschaft, einschließlich abiotischer Faktoren wie Trockenheit, Nährstoffverfügbarkeit und biotische Faktoren wie Wirt-Mikroben- und Mikroben-Mikroben-Wechselwirkungen.

Durch quantitative trait loci (QTL)-Kartierung von rekombinanten Inzuchtlinien (RILs), die durch Kreuzung von schwedischen und italienischen *A. thaliana* Ökotypen erzeugt wurden, identifizierten wir ein QTL, welches mit einer partiellen Resistenz gegen den biotrophen Oomyceten-Erreger *Albugo laibachii* assoziiert ist. Darüber hinaus haben wir gezeigt, dass das Beherbergen des QTLs einen signifikanten Fitnessvorteil an Standorten mit *Albugo* sp. aufweist. Dies implizieren, dass die *Albugo* sp. einen evolutionären Druck auf seinen Wirt, *A. thaliana* ausübt, der lokale Anpassung verursacht.

Des Weiteren konnte ich zeigen, dass nicht nur der genetische Hintergrund des Wirts, sondern auch Mikroben-Mikroben-Interaktionen zum Sporulationserfolg von *A. laibachii* beitragen. Amplicon-Sequenzierung, gefolgt von relativer Abundanz-basierender Netzwerkberechnungen einer natürlichen *A. thaliana*-Population, erlaubte es mir, potentielle Interaktionspartner der hochgradig vernetzten "Hub" -Mikrobe *Albugo* vorherzusagen. Um netzwerkbasierter Vorhersagen zu überprüfen, isolierte ich Pilze und Bakterien der Phyllosphäre und ko-inokulierte sie mit *A. laibachii* unter gnotobiotischen Bedingungen. Eine weitere Hub-Mikrobe, die Basidiomyceten-Hefe *Dioszegia hungarica* (*D. hungarica*), fördert die Sporulation von *A. laibachii* und validierte damit unsere netzwerkbasierter Vorhersage *in planta*. Darüber hinaus verifizierte ich zusätzliche Wechselwirkungen, die durch das Netzwerk zwischen *D. hungarica* und sechs Blattbakterien vorhergesagt wurden, *in planta*. Hier verringert insbesondere *D. hungarica* das Wachstum von *Caulobacter* sp. welches selbst eine Hub-Mikrobe ist. Zusammengefasst hebt dies das Zusammenspiel von Mikroben hervor, die Mikrobielle Gemeinschaften in der Phyllosphäre steuern.

Um mikrobielle Netzwerke kohärent zu verstehen, reichen statische Gemeinschaftskompositionen nicht aus. Hierfür braucht es kausale Faktoren und Dynamiken, welche sich hinter zeitabhängigen Gemeinschaftsanordnungen verbergen. Ich führte daher ein Gartenexperiment durch, bei dem *A. thaliana* Pflanzen in einem Zeitraum von fünf Monaten in drei aufeinander folgenden Jahren beprobt wurden. Ich identifizierte Mitglieder des Kern-Mikrobiotas, die ihre Netzwerkposition im Laufe der Zeit als Schlüsselfaktoren für eine Erhöhung der Konnektivität und Stabilität von mikrobiellen Gemeinschaften beibehalten. Ich nenne diese kleine Gruppe von stabilen, zeitunabhängigen Kern-Mikroben-Taxa "persistent Keystone-microbes", kurz PerKy-Mikroben. Detaillierte Analysen von PerKy-Mikroben in komplexen synthetischen mikrobiellen Gemeinschaften bestätigten ihren Einfluss auf die kommunale Funktion bei biotischer Störung, indem das Wachstum des biotrophen Erregers *Pseudomonas syringae* reduziert wurde. Die Entdeckung, dass PerKy-Mikroben die kommunale Stabilität in hochdynamischen natürlichen Netzwerken beeinflussen, ist der Schlüssel zur Entwicklung persistenter mikrobieller Gemeinschaften für den Einsatz unter schwankenden Umweltbedingungen. Daher könnten meine Ergebnisse die Lücke zwischen der Entwicklung effizienter Probiotika unter kontrollierten Laborbedingungen und ihrer erfolgreichen Anwendung in der kommerziellen Landwirtschaft schließen.

Zusammenfassend identifizierte ich neuartige Merkmale, die die Besiedlung mikrobieller Hubs und Pathogenen regulieren. Diese Merkmale reichen von der Interaktion zwischen Wirt und Mikroben und zwischen Mikroben-Mikroben in einem synthetischen Gemeinschaftskontext. Aus diesem Grund heben sie die volle Komplexität hervor, mit der mikrobiellen Besiedlung in der Phyllosphäre gesteuert wird.